

PCT
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)



<p>(51) Internationale Patentklassifikation 5 : C12N 15/82, 15/29, 5/10 A01H 5/00</p>	<p>A1</p>	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 94/01571</p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 20. Januar 1994 (20.01.94)</p>		
<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; vertical-align: top; padding: 5px;"> <p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP93/01769</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 7. Juli 1993 (07.07.93)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: P 42 22 407.1 8. Juli 1992 (08.07.92) DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V. [DE/DE]; Bunsenstrasse 10, D-37073 Göttingen (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US) : MASS, Christoph [DE/DE]; Kolibriweg 14, D-50829 Köln (DE). SCHELL, Jeff [DE/DE]; Carl-von-Linné-Weg 12, D-50829 Köln (DE). STEINBISS, Hans-Henning [DE/DE]; Heckhaus 52, D-53804 Much (DE).</p> </td> <td style="width: 50%; vertical-align: top; padding: 5px;"> <p>(74) Anwalt: BÜHLING, Gerhard; Tiedtke-Bühling-Kinne & Partner, Bavariaring 4, D-80336 München (DE).</p> <p>(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i></p> </td> </tr> </table>			<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP93/01769</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 7. Juli 1993 (07.07.93)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: P 42 22 407.1 8. Juli 1992 (08.07.92) DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V. [DE/DE]; Bunsenstrasse 10, D-37073 Göttingen (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US) : MASS, Christoph [DE/DE]; Kolibriweg 14, D-50829 Köln (DE). SCHELL, Jeff [DE/DE]; Carl-von-Linné-Weg 12, D-50829 Köln (DE). STEINBISS, Hans-Henning [DE/DE]; Heckhaus 52, D-53804 Much (DE).</p>	<p>(74) Anwalt: BÜHLING, Gerhard; Tiedtke-Bühling-Kinne & Partner, Bavariaring 4, D-80336 München (DE).</p> <p>(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i></p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP93/01769</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 7. Juli 1993 (07.07.93)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: P 42 22 407.1 8. Juli 1992 (08.07.92) DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V. [DE/DE]; Bunsenstrasse 10, D-37073 Göttingen (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US) : MASS, Christoph [DE/DE]; Kolibriweg 14, D-50829 Köln (DE). SCHELL, Jeff [DE/DE]; Carl-von-Linné-Weg 12, D-50829 Köln (DE). STEINBISS, Hans-Henning [DE/DE]; Heckhaus 52, D-53804 Much (DE).</p>	<p>(74) Anwalt: BÜHLING, Gerhard; Tiedtke-Bühling-Kinne & Partner, Bavariaring 4, D-80336 München (DE).</p> <p>(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i></p>			
<p>(54) Title: MODULAR PROMOTER CONSTRUCT</p> <p>(54) Bezeichnung: MODULARTIGES PROMOTOR-KONSTRUKT</p> <p>(57) Abstract</p> <p>A modular promoter construct contains a promoter active in vegetable cells and a DNA sequence from the exon 1 of the rice actin 1 gene. This modular promoter construct allows a considerable increase of gene expression in vegetable-cells, if required with other regulatory DNA sequences.</p> <p>(57) Zusammenfassung</p> <p>Es wird ein modulartiges Promotor-Konstrukt beschrieben, das einen in Pflanzenzellen wirksamen Promotor und eine DNA-Sequenz aus dem Exon 1 des Aktin 1-Gens aus Reis aufweist. Dieses modulartige Promotor-Konstrukt führt ggf. mit weiteren regulatorischen DNA-Sequenzen zu einer beträchtlichen Steigerung der Genexpression in Pflanzenzellen.</p>				

Dhugga, et al.
S/N 10/080,114

REF
A11

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	FI	Finnland	MR	Mauritanien
AU	Australien	FR	Frankreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GA	Gabon	NE	Niger
BE	Belgien	GB	Vereinigtes Königreich	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GN	Guinea	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	GR	Griechenland	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	HU	Ungarn	PL	Polen
BR	Brasilien	IE	Irland	PT	Portugal
BY	Belarus	IT	Italien	RO	Rumänien
CA	Kanada	JP	Japan	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SD	Sudan
CG	Kongo	KR	Republik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slowakische Republik
CM	Kamerun	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CN	China	LU	Luxemburg	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LV	Lettland	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	MC	Monaco	UA	Ukraine
DE	Deutschland	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
DK	Dänemark	ML	Mali	UZ	Usbekistan
ES	Spanien	MN	Mongolei	VN	Vietnam

Modulartiges Promotor-Konstrukt

1 Die Erfindung betrifft ein modulartiges Promotor-Konstrukt auf der Basis des Exon 1 des Aktin 1-Gens aus Reis.

5 Es bestand schon immer das Bedürfnis, agronomisch wichtige Getreidepflanzen mit verbesserten Eigenschaften auszustatten. Früher hat man auf klassischem Wege Erbanlagen bzw. Gene in die betreffenden Pflanzen eingekreuzt. Seit Etablierung der Gentechnologie ist es möglich, definierte Gene in das Genom
10 von Getreidepflanzen, wie beispielsweise Reis, Mais, Weizen und Gerste, einzuschleusen. Neben der Auswahl des richtigen selektiven Marker-Gens und der agronomisch wichtigen Gene ist die Wahl des richtigen Promotors zur effektiven Expression des gewünschten Gens maßgeblich. Der am meisten verwendete Promo-
15 tor zur Erhöhung der Expression von chimären Genen in monokotyledonen Getreidepflanzen stammt aus dem Cauliflower Mosaic Virus (CaMV) 35S RNA-Gen (Odell et al., Nature 313, Seiten 810 bis 820, 1985). Dieser Promotor ist jedoch im Vergleich zu di-
20 kotyledonen Pflanzen relativ wenig aktiv in monokotyledonen Pflanzen (Töpfer et al., Meth. Enzymol., "Rec. DNA", im Druck). So sind alternative Genexpressionsvektoren unter Ver-
wendung starker Promotoren, wie die Promotoren des Aktin 1-Gens aus Reis (Mc Elroy et al., Plant Cell 2, Seiten 163 bis 171, 1990) und des Ubiquitin-Gens aus Mais (Christensen and
25 Fox, International Society for Plant Molecular Biology Meeting, Program Abstracts, No. 287, 1991) beschrieben worden.

In Analogie zu tierischen Systemen (Dylan, Cell 58, Seiten 1 bis 4, 1989) ist es ebenfalls für Pflanzengene wahrscheinlich,
30 daß die durch die RNA-Polymerase II vermittelte Transkription von modulartigen, d.h. aus verschiedenen regulierenden DNA-Sequenzen bestehenden Elementen abhängt. Es ist bereits für eine Anzahl von verschiedenen modulartigen Elementen gezeigt wor-
den, daß sie eine wichtige Rolle bei z.B. der gewebespezifischen Transkription spielen (Katagiri und Chua, Trends Gent.
35 8, Seiten 22 bis 70, 1992).

1

2

So ist aus der DE-OS 41 24 537 eine modulartige Promotor-Konstruktion bekannt, mit der die Genexpression fremder Gene in Pflanzenzellen gesteigert werden kann. Dabei wird eine DNA-Sequenz aus dem Exon 1 des Saccharosesynthase-Gens aus *Zea mays* L. zwischen Promotor und das zu exprimierende Gen eingesetzt. Eine weitere multiplikative Steigerung der Genexpression ist möglich, wenn an die genannte DNA-Sequenz eine weitere DNA-Sequenz gekoppelt wird, die im wesentlichen dem Intron 1 aus dem Saccharosesynthase-Gen aus *Zea mays* L. entspricht.

Die Isolierung von in der 5'-Region liegenden Promotorsequenzen des Aktin 1-Gens aus Reis ist von Mc Elroy et al., a.a.O., beschrieben worden. Es hat sich herausgestellt, daß eine positive Korrelation zwischen den Promotorsequenzen und den nachfolgenden Intronsequenzen besteht. So hat sich ein Promotor-Konstrukt aus diesen Sequenzen bei Transformationsuntersuchungen von Reis-Protoplasten als wirksamer Regulator der konstitutiven Expression eines fremden Gens erwiesen.

Der vorliegenden Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, einen Promotor zur Verfügung zu stellen, mit dem man fremde Gene in Pflanzen mit hoher Effizienz exprimieren kann.

Diese Aufgabe wird durch ein modulartiges Promotor-Konstrukt gemäß Patentanspruch 1 gelöst.

Die Unteransprüche betreffen bevorzugte Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Promotor-Konstrukts.

Die Erfindung betrifft somit ein modulartiges Promotor-Konstrukt, das einen in Pflanzenzellen wirksamen Promotor und eine DNA-Sequenz aus dem Exon 1 des Aktin 1-Gens aus Reis aufweist und die Allele sowie Derivate dieses modulartigen Promotor-Konstrukts.

1 Die Erfindung betrifft weiterhin Vektoren, die die erfindungs-
gemäßen Promotor-Konstrukte enthalten.

5 Die Erfindung betrifft ebenfalls Pflanzenzellen, die mit den
genannten Vektoren transformiert sind.

Die Erfindung betrifft außerdem Pflanzen und deren Vermeh-
rungsgut, die aus den genannten Pflanzenzellen regeneriert
sind.

10 Schließlich betrifft die Erfindung auch die Verwendung der er-
findungsgemäßen Promotor-Konstrukte zur Herstellung von Pflan-
zen mit erhöhter Genexpression.

15 Die Figuren dienen zur Erläuterung der Erfindung. Es zeigen:

Fig. 1 chimäre Genkonstrukte für transiente Gen-
expressionsexperimente,

20 Fig. 2 eine schematische Darstellung des Aktin 1 (Akt
1)-Gens aus Reis mit der verwendeten Exon 1-
DNA-Sequenz,

25 Fig. 3 ein Dünnschichtchromatogramm der transienten
Expression von chimären Konstrukten in *Hordeum
vulgare* Protoplasten,

30 Fig. 4 ein Dünnschichtchromatogramm der transienten
Expression von chimären Konstrukten in *Triticum
monococcum* Protoplasten und

Fig. 5 ein Dünnschichtchromatogramm einer weiteren
transienten Genexpression in *Hordeum vulgare*
Protoplasten.

35

1 Bei dem erfindungsgemäßen Promotor-Konstrukt handelt es sich
um einen die RNA-Polymerase II stimulierenden Promotor. Das
erfindungsgemäße modulartige Promotor-Konstrukt weist einen in
Pflanzenzellen wirksamen Promotor und eine daran gekoppelte
5 regulatorische DNA-Sequenz auf. Diese DNA-Sequenz stammt aus
dem Exon 1 des Aktin 1-Gens (Akt1-Exon1-Sequenz) aus Reis. Die
im Promotor-Konstrukt enthaltene DNA-Sequenz entspricht vor-
zugsweise der Sequenz von der Position +4 bis +57 im Exon 1
des Aktin 1-Gens, wie aus Fig. 2 zu entnehmen ist. Das
10 untranslatierte Exon 1 ist vom Startpunkt der Translation in
Exon 2 durch ein Intron (Intron 1) getrennt. Das Exon 1 liegt
somit in der 5'-transkribierten, jedoch untranslatierten
Region des Aktin 1-Gens. Die gesamte Sequenz des Exon 1 des
genannten Gens ist bei Mc Elroy et al., (a.a.O.) beschrieben.

15 Die Akt1-Exon1-Sequenz ist GC-reich (77 %) und wirkt als die
RNA-Polymerase II stimulierende Element, wenn es sich in
downstream-Richtung der Transkriptionsstartstelle befindet.

20 Es wurde gefunden, daß, wenn das erfindungsgemäße modulartige
Promotor-Konstrukt an ein in einer Pflanzenzelle zu exprimie-
rendes Gen gekoppelt ist, die Expression dieses Gens erheblich
gesteigert wird, wobei eine mindestens 10-fache Steigerung der
Genexpression festgestellt werden konnte.

25 Die Genexpression kann weiterhin um das 100-fache erhöht wer-
den, wenn die Akt1-Exon1-Sequenz mit dem Intron 1 des Saccha-
rosesynthase-Gens aus *Zea mays* kombiniert wird, was überra-
schenderweise zu einer Erhöhung der Genexpression auf bis min-
30 destens das 1000-fache führt.

Es hat sich herausgestellt, daß die 18 bp OTF-Bindungsstelle
des Promotors der Octopinsynthase (OCS-Enhancer) bei-
35 spielsweise mit dem CaMV 35S-Promotor kompatibel ist. Wenn man

1 die OTF-Bindungsstelle mit der Akt1-Exon1-Sequenz und dem In-
tron 1 aus dem Saccharosesynthase-Gen aus *Zea mays L.* kombi-
niert, erhält man eine sprunghafte Steigerung der Genaktivität
um mindestens das 4000-fache.

5

Aus dem Vorstehenden ergibt sich, daß sich die Genexpression
in Abhängigkeit von der mit dem zu exprimierenden Gen
gekoppelten regulativen DNA-Sequenz multipliziert. Somit kann
mit dem erfindungsgemäßen modulartigen Promotor-Konstrukt eine
10 Multiplikation der Genaktivität erreicht werden.

Die erfindungsgemäßen modulartigen Promotor-Konstrukte sowie
die Vektoren enthalten als einen Pflanzenzellen wirksamen Pro-
motor, wie beispielsweise den CaMV 35S-Promotor, den
15 Nopalinsynthase-Promotor oder den Saccharosesynthase-Promotor.

Das erfindungsgemäße modulartige Promotor-Konstrukt eignet
sich für die Expression aller Arten von Fremdgenen, wie bei-
spielsweise Resistenzgenen, wie sie z.B. aus der EP-A 0 257
20 542 und der EP-A 0 275 957 bekannt sind, wie auch zur
Herstellung von proteinogenen Wirkstoffen in Pflanzen
beispielsweise nach DD-A 12 65 164. Von besonderer Bedeutung
sind Gene für Speicherproteine, wie z.B. Zeine oder Hordeine.

25 In downstream-Richtung an das zu exprimierende Gen enthalten
die erfindungsgemäßen modulartigen Promotor-Konstrukte sowie
die Vektoren, die die erfindungsgemäßen Promotor-Konstrukte
enthalten, Polyadenylierungsregionen aus dem CaMV 35S- oder
Octopinsynthase (OCS)-Gen (Hein et al., Mol. Gen. Genet, 199,
30 Seiten 161 bis 168 (1985)).

Das erfindungsgemäße modulartige Promotor-Konstrukt eignet
sich zur Expression fremder Gene in monokotyledonen und diko-
tyledonen Pflanzen. Als monokotyledone Pflanzen kommen bei-
35 spielsweise Getreidepflanzen, wie Weizen, Gerste, Mais und

1 Reis in Frage. Als dikotyledone Pflanze läßt sich z.B. Tabak
(*Nicotiana tabaccum*) in zufriedenstellender Weise transformie-
ren.

5 Es ist selbstverständlich, daß im Rahmen der Erfindung auch
allelische Varianten und Derivate des oben genannten modul-
artigen Promotor-Konstrukts erfaßt sind, unter der Vorausset-
zung, daß diese modifizierten modulartigen Promotor-Konstrukte
10 die gleiche Funktion wie die oben genannten Promotor-Kon-
strukte ausüben, d.h. stimulierend auf die Genexpression wir-
ken. Zu den allelischen Variationen und Derivaten zählen bei-
spielsweise Deletionen, Substitutionen, Insertionen, Inversio-
nen oder Additionen der einzelnen Sequenzen des erfin-
dungsgemäßen Promotor-Konstrukts.

15 Die Transformation von Pflanzen mit einem fremden Gen unter
Verwendung des erfindungsgemäßen modulartigen Promotor-Kon-
strukts kann mit Hilfe üblicher Transformationsverfahren
durchgeführt werden. Besonders bevorzugt ist die Protoplasten-
20 transformation mit anschließender Regeneration der aus den
transformierten Protoplasten entstandenen Pflanzenzellen zu
einer Pflanze.

25 In den nachfolgenden Beispielen werden besonders bevorzugte
Ausführungsformen des erfindungsgemäßen modulartigen Promotor-
Konstrukts beschrieben.

Beispiel 1

Plasmidkonstruktionen

30 Die nachfolgend beschriebenen Plasmidkonstruktionen lassen
sich der Fig. 1 entnehmen. Die dort gezeigten chimären Genkon-
struktionen wurden für transiente Genexpressionsexperimente
verwendet. Die Startstelle der Transkription und das Po-
35 lyadenylierungssignal des CaMV 35S-Gens sind in allen Kon-

1 strukturen gleich. Die für das Klonieren relevanten Restrik-
tionsstellen sind zusätzlich eingeführt worden. Der Polylinker
(P) zwischen dem Transkriptions- und Translationsstart umfaßt
vom 5'- zum 3'-Ende die Restriktionsstellen X, D, EI und K.
5 Die Restriktionsstellen werden folgendermaßen abgekürzt: *BclI*
(B), *EcoRI* (EI), *EcoRV*, (EV), *HindIII* (H), *HincII* (A), *KpnI*
(K), *SmaI* (S), *SstII* (C), *XhoI* (X). Der CaMV 35S-Promotor ist
mit "enhancer core" und die OTF-Bindungsstelle mit "OCS" ge-
kennzeichnet.

10

Sämtliche Plasmidkonstruktionen wurden nach üblichen Verfah-
ren, wie sie beispielsweise bei Sambrook et al, Molecular clo-
ning: A laboratory manual, 2nd edition, Cold Spring Harbor La-
boratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989, beschrie-
ben sind, hergestellt.

15

Alle Plasmidkonstruktionen leiten sich vom chimären Plasmid
pRT 101 CAT ab (Pröls et al., Plant Cell. Rep. 7, Seiten 221
bis 224, 1988), welches das CAT-Markergen (CAT = Chlorampheni-
col-Transacetylase) enthält. Zur Herstellung des chimären
20 Plasmids pCM 1106 wurde die nicht-translatierte Sequenz des
Exon 1 des Aktin 1-Gens (Akt1-Exon1-Sequenz) von der Position
+4 bis +57 in die einzige *SmaI*-Restriktionsstelle (S) im 5'-
nicht translatierten Leader des pRT 101 CAT-Plasmids einge-
fügt. Hierzu sei auf die Fig. 2 verwiesen, woraus die verwen-
dete Sequenz aus dem Exon 1 und ihre Position innerhalb des
25 Exon 1 zu entnehmen ist. Bei Einführung der genannten DNA-Se-
quenz stellt man die *SmaI*-Restriktionsstelle durch 3'-termi-
nale Cystosinreste des Aktin 1-Elements wieder her (siehe auch
30 Fig. 2, Position +55 bis +57).

30

Man isoliert die Intron 1-Sequenzen aus dem Saccharosesyn-
thase-Gen (*Sh1*) aus Mais (Position +43 bis +1084) aus dem aus
der DE-OS 41 24 537 bekannten chimären Plasmid pSP 1076 + 1084
35 als *HincII*-Restriktionsfragment und fügt es in die *SmaI*-Re-

35

1 striktionsstelle von pCM 1106. Auf diese Weise erhält man die
chimäre Plasmidkonstruktion pCM 1111.

5 Man synthetisiert mit einem DNA-Synthesizer (Applied Biosystem
380 B) die in Fig. 2 gezeigte Sequenz aus dem Exon 1 des Aktin
1-Gens aus Reis und die 18 bp OTF-Bindungsstelle mit der Se-
quenz AACGTAAGCGCTTACGTT (Ellis et al., EMBO J. 6, Seiten 3203
bis 3208, 1987). Man subkloniert dann die OTF-Bindungsstelle
10 in die einzige *Sma*I-Restriktionsstelle des handelsüblichen
Plasmids pUC 19 und erhält pOTF 18. Für die Herstellung der
chimären Plasmide pCM 1112 und pCM 2107 isoliert man aus pCM
1111 und pCM 2106 ein *Hinc*II (A)/*Hind*III (H)-Restriktionsfrag-
ment (*Hind*III ist ein partieller Verdau von pCM 1111) und fügt
es in die einzige *Hinc*II-Restriktionsstelle von pOTF 18 ein.

15 Für die Herstellung des Plasmids pCM 1107 entfernt man den Po-
lylinker des chimären Plasmids pCM 1106 durch eine Restrikti-
onsverdauung mit *Xho*I (X) / *Kpn*I (K). Man entfernt die über-
stehenden Enden mit einer vorsichtigen *S1*-Behandlung. Die Au-
tolegierung führt zu dem Plasmidkonstrukt pCM 1107, welches im
20 Vergleich zu pCM 1106 eine Deletion von 11 Basenpaaren zwi-
schen der Stelle des Transkriptionsstartes und der Akt1-Exon1-
Sequenz aufweist.

25 Das Promotordeletionsplasmid pCM 2106 wird hergestellt, indem
CaMV 35S-Promotorsequenzen von pCM 1106 in upstream-Richtung
der *Eco*RV (EV)-Restriktionsstelle bei Position -90 entfernt
werden.

30 Beispiel 2

2.1 Analyse der transienten Expression

Man führt nach der für Mais beschriebenen Methode (Maas und
Werr, Plant Cell. Rep. 8, Seiten 148 bis 151, 1989) eine Pro-
35 toplastenisolation aus einer Zellsuspension der Gerstenlinie

1 *Hordeum vulgare* L. cv. Golden Promise mit der Maßgabe durch,
daß man eine Osmolarität von 720 mosm verwendet. Die Aufzucht
einer Zellsuspension der Linie *Triticum monococcum* (Einkorn)
und Protoplastenisolation wurde wie im wesentlichen durch Lörz
5 et al., Mol. Gen. Genet. 199, Seiten 178 bis 182, 1985 und
Matzeit et al., Plant Cell 3, Seiten 247 bis 258, 1991)
beschrieben, durchgeführt.

Die Transformation der *Hordeum vulgare* und *Triticum monococcum*
10 Protoplasten wurde wie bei Maas und Werr a.a.O. und Maas et
al., a.a.O., beschrieben durchgeführt. Man transformiert etwa
 1×10^6 Protoplasten mit 25 µg Plasmid-DNA und 100 µg soni-
fizierter Kalbsthymus-DNA und fügt einen durch PEG ver-
mittelten Gentransfer durch (PEG-Lösung: 25 % PEG (1500), 0,1
15 M $MgCl_2$, pH 6,0). Man untersucht die Genexpression anhand des
Gehalts an gebildetem Protein 15 bis 19 Stunden nach der
Transformation.

2.2 Bestimmung der CAT-Aktivität

20 Man zentrifugiert die transformierten Zellen für die CAT-Akti-
vitätsbestimmung, resuspendiert in 60 µl 500 mM Tris/HCl bei
einem pH-Wert von 7,5 (2 mM PMSF) und lysiert in zwei Zyklen
unter Frieren und Tauen. Man klärt den Extrakt durch Zentrifu-
gieren auf. Man verwendet 20 µl des Überstandes zur Proteinbe-
25 stimmung gemäß Bradford, Anal. Biochem. 72, Seiten 248 bis
254, 1976. Die CAT-Aktivitätsbestimmung wird, wie im wesentli-
chen durch Gorman et al., Mol. Cell. Biol. 2, Seiten 1044 bis
1051, 1982 beschrieben, über Dünnschichtchromatographie durch-
30 geführt. Die Extrakte wurden während 10 Minuten bei 65°C
vorinkubiert, wobei 250 µg BSA in die Reaktionsmischung hin-
zugefügt wurde.

Für jedes Plasmidkonstrukt wurde parallel zwei Transforma-
35 tionen durchgeführt. Man kultiviert die behandelten Protopla-

1 sten und vereinigt sie, um die Unterschiede durch die ver-
 schiedensten Transformationsleistungen herabzusetzen. Man analy-
 siert eine Hälfte (1×10^6 Protoplasten) dieser Mischung auf
5 CAT-Aktivität. Aufgrund der hohen CAT-Aktivitäten in unver-
 dünnten Extrakten stellt man serienmäßig 1:10-Verdünnungen
 (1:10, 1:100, 1:1000) her, um somit lineare CAT-Aktivitäten
 für die densitometrische Untersuchung der Autoradiographien zu
 erhalten.

10 2.3 Untersuchungsergebnisse

2.3.1 *Hordeum vulgare*

 Die Untersuchungen der Genexpression in *Hordeum vulgare* Proto-
 plasten mit den in Beispiel 1 beschriebenen chimären Plasmiden
15 hat zu folgenden Ergebnissen geführt.

 Die Ergebnisse der relativen CAT-Aktivitäten lassen sich dem
 Dünnschichtchromatogramm der Fig. 3 entnehmen. Aufgrund der
 hohen CAT-Aktivitäten im Rohextrakt wurde die Aktivität einer
20 1:100-Verdünnung mit 1×10^4 Protoplasten gemessen. Die Abkür-
 zungen haben folgende Bedeutungen: CAT = Chloramphenicol-
 Transacetylase; Cm = C^{14} -markiertes Chloramphenicol allein;
 Cont = Proteinextrakte von nicht transformierten Kontrollpro-
 toplasten und 1, 3, 1,3 Cm = an den angegebenen Positionen
25 acetyliertes Chloramphenicol.

 Es ergibt sich beim chimären Plasmid pCM 1106 im Vergleich zum
 Referenzplasmid pRT 101 CAT eine bis zu mindestens 10-fache
30 Erhöhung der Markergenexpression.

 Am chimären Plasmid pCM 1111 ist zu erkennen, daß, wenn die
 Akt1-Exon1-Sequenz mit den Intron 1-Sequenzen aus dem
 Saccharosesynthase-Gen kombiniert wird, die Markergenexpres-
 sion auf das mindestens 1000-fache erhöht wird.
35

1 Die 18 bp OTF-Bindungsstelle des Octopinsynthese-Promotors mit
dem gesamten CaMV 35S-Promotor kann mit der Akt1-Exon1-Sequenz
sowie dem Intron 1 aus dem Saccharosesynthase-Gen interagie-
ren. Die Einführung der OTF-Bindungsstelle in das chimäre
5 Plasmid pCM 1111, welches die Akt1-Exon1-Sequenz und Sequenzen
aus dem Intron 1 des Saccharosesynthase-Gen enthält, führt zu
einer weiteren mindestens 3- bis 4-fachen Erhöhung des Stimu-
lationsverhältnisses (siehe pCM 1112). Dieses Ergebnis erhält
man auch mit einer 1:1000-fachen Verdünnung (nicht gezeigt).
10 Somit ist eindeutig belegt, daß die stimulierende Wirkung der
Kombination aus verschiedenen individuellen DNA-Sequenzen mul-
tiplikativ und nicht additiv ist.

15 In diesem Zusammenhang wird auf die nachfolgende Tabelle 1
verwiesen, worin die CAT-Aktivitäten aus Fig. 3 der chimären
Plasmide pCM 1106, pCM 1111 und pCM 1112 in Relation zum Referenzplasmid pRT 101 CAT (Aktivität = 1) in *Hordeum vulgare*
Protoplasten aufgeführt sind.

20 Tabelle 1

pRT 101 CAT	pCM 1106	pCM 1111	pCM 1112
1	7,5-12,5	872-1242	3897-6985

25

2.3.2 *Triticum monococcum*

30 Die Untersuchungen der Genexpression in *Triticum monococcum*
Protoplasten mit den in Beispiel 1 beschriebenen chimären
Plasmiden hat zu folgenden Ergebnissen geführt.

Wie sich aus Fig. 4 entnehmen läßt, erreicht man mit
transformierten *Triticum monococcum* Protoplasten gleiche Sti-
35 mulationsverhältnisse der Genexpression wie mit *Hordeum vul-*

1 gare Protoplasten. So führt die Einfügung der Akt1-Exon1-Se-
quenz zu einer mindestens 10-fachen Erhöhung der Mar-
kergenexpression (pCM 1106). Die Kombination der Akt1-Exon1-
Sequenz mit den Intron 1-Sequenzen des Saccharosesynthase-Gens
5 ergeben eine mindestens 1000-fache Erhöhung der Genexpression.

In diesem Zusammenhang wird auf die nachfolgende Tabelle 2
verwiesen, worin die CAT-Aktivitäten der chimären Plasmide pCM
1106 und pCM 1111 der Fig. 4 in Relation zum chimären Refe-
10 renzplasmid pRT 101 CAT (Aktivität = 1) verglichen werden.

Tabelle 2

15	pRT 101 CAT	pCM 1106	pCM 1111
	1	7,5-11,9	913-1203

Das Dünnschichtchromatogramm in Fig. 5 zeigt, daß die Akt1-
Exon1-Sequenz nicht ohne regulatorische Sequenzen in upstream-
20 Richtung zu einer Erhöhung der Genexpression führt. Die Akt1-
Exon1-Sequenz erhöht die Markergenexpression bis auf das min-
destens 10-fache, wenn sie in downstream-Richtung des gesamten
CaMV 35S-Promotors eingefügt ist (pCM 1106). Dagegen hebt die
Deletion des CaMV 35S-Promotor im chimären Plasmid pCM 1106
25 (pCM 2106, Fig. 1) das Stimulationsvermögen der Akt1-Exon1-Se-
quenz völlig auf.

Da die Akt1-Exon1-Sequenz die Anwesenheit von regulatorischen
Elementen in upstream-Richtung zur effektiven Markergenexpres-
30 sion benötigt, kann die Aktivität des chimären Plasmids pCM
2106 durch Einfügung von regulatorischen Elementen in up-
stream-Richtung wieder hergestellt werden. So wurde die 18 bp
OTF-Bindungsstelle als regulatorische Sequenz in upstream-
Richtung des CaMV 35S-Promotors des chimären Plasmids pCM 2106
35 unter Bildung des chimären Plasmids pCM 2107 eingefügt (siehe

1 auch Fig. 1). Die transiente Genexpression des chimären Plas-
mids pCM 2107 zeigt, daß die Akt1-Exon1-Sequenz im nicht sti-
mulierenden chimären Plasmid pCM 2106 wieder ihre mindestens
5 10-fache stimulierende Wirkung entfaltet, wenn das Plasmid die
OTF-Bindungsstelle enthält.

Am Beispiel der chimären Plasmide pCM 1106 und pCM 1107 ist zu
erkennen, daß die Entfernung zur Transkriptionsstartstelle des
heterologen Promotors ebenfalls sehr wichtig ist. Die Deletion
10 von 11 Basenpaaren im Polylinker von pCM 1106, die sich zw-
ischen der Transkriptionsstartstelle und den Akt1-Exon1-Sequen-
zen befinden, heben die stimulatorische Wirkung des Promotor-
konstrukts auf (pCM 1107). Demnach sollte die Entfernung zw-
ischen Transkriptionsstartstelle und Akt1-Exon1-Sequenz bevor-
15 zugt mindestens 11 bp betragen.

Die relativen Werte der Erhöhung der Genexpression anhand der
in Fig. 5 gezeigten chimären Plasmiden sind aus der nachfol-
genden Tabelle 3 zu entnehmen. In dieser Tabelle werden die
20 CAT-Aktivitäten der chimären Plasmide pCM 1106, pCM 1107, pCM
2106 und pCM 2107 in Relation zum chimären Referenzplasmid pRT
101 CAT (Aktivität = 1) in *Hordeum vulgare* Protoplasten
verglichen.

25

Tabelle 3

pRT 101 CAT	pCM 1106	pCM 1107	pCM 2106	pCM 2107
1	8,1-12,4	0,8-1,2	0,8-1,15	8,9-14,5

30

Bei dem erfindungsgemäßen modulartigen Promotor-Konstrukt han-
delt es sich somit um einen ggf. aus einzelnen regulativen
DNA-Sequenzen aufgebauten effektiven Promotor, mit dem es mög-
lich ist, die Genexpression fremder Gene in Pflanzenzellen auf
35 das bis zu mindestens 4000-fache zu erhöhen. Eine zentrale

1 Rolle spielt eine DNA-Sequenz aus dem 5'-nicht translatierten
Bereich des Exon 1 des Aktin 1-Gens aus Reis. Diese Sequenz
ist ein die RNA Polymerase II stimulierendes cis-Element, das
5 sich in downstream-Richtung der Transkriptionsstartstelle
befinden muß und nur in Gegenwart von regulatorischen DNA-
Sequenzen in upstream-Richtung seine stimulierende Wirkung auf
die Genexpression entfaltet.

10

15

20

25

30

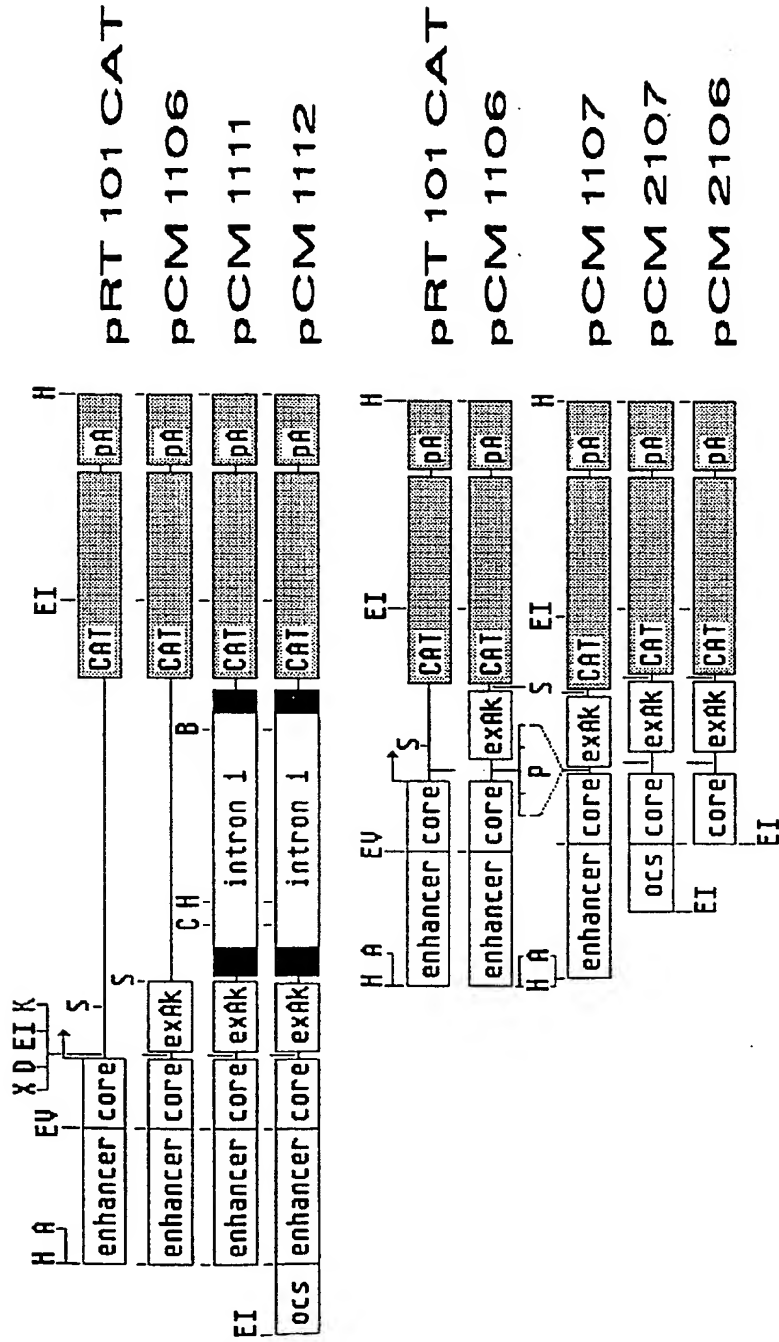
35

Patentansprüche

1. Modulartiges Promotor-Konstrukt, das einen in Pflanzenzellen wirksamen Promotor und eine DNA-Sequenz aus dem Exon 1 des Aktin 1-Gens aus Reis aufweist und die Allele sowie Derivate dieses modulartigen Promotor-Konstrukts.
2. Promotor-Konstrukt nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die DNA-Sequenz der Position +4 bis +57 im Exon 1 des Aktin 1-Gens entspricht.
3. Promotor-Konstrukt nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß es weiterhin eine DNA-Sequenz aus dem Intron 1 des Saccharosesynthase-Gens von Mais enthält.
4. Promotor-Konstrukt nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß es zusätzlich eine 18 bp OTF-Bindungsstelle enthält.
5. Vektor, enthaltend ein Promotor-Konstrukt nach einem der Ansprüche 1 bis 4, das an ein in einer Pflanzenzelle zu exprimierendes Gen gekoppelt ist.
6. Pflanzenzelle, die mit einem Vektor nach Anspruch 5 transformiert ist.
7. Pflanze und deren Vermehrungsgut, regeneriert aus einer Pflanzenzelle nach Anspruch 6.
8. Verwendung des Promotor-Konstrukts nach den Ansprüchen 1 bis 4, zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhter Genexpression.

5

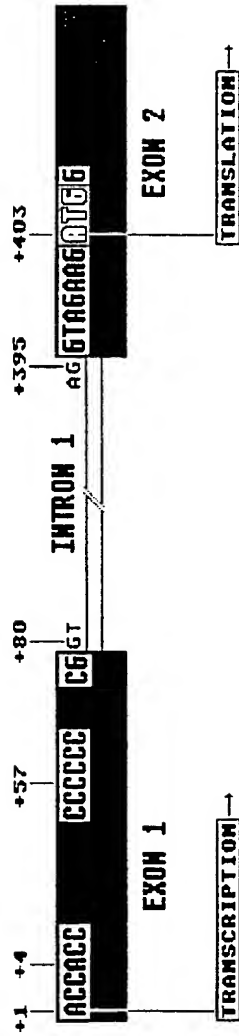
FIG. 1



2/5

FIG. 2

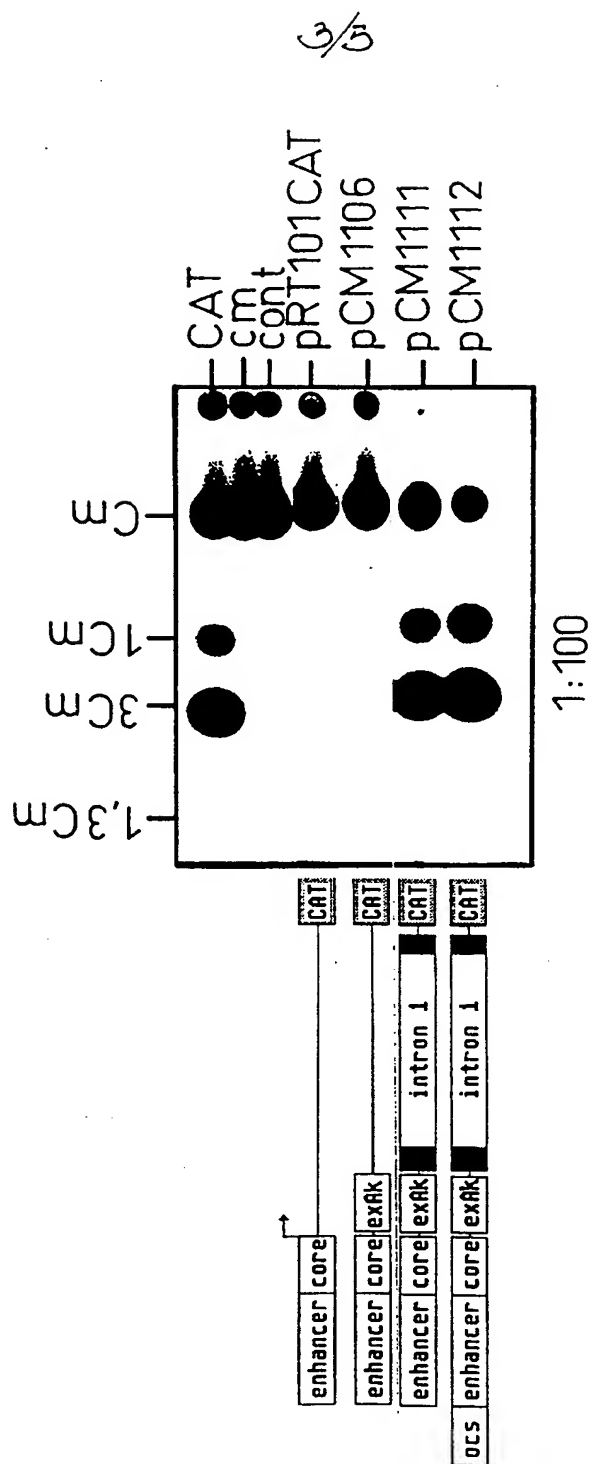
Aktin 1 (Act1) Gen (Reis)



Verwendete Exon1-DNA-Sequenz

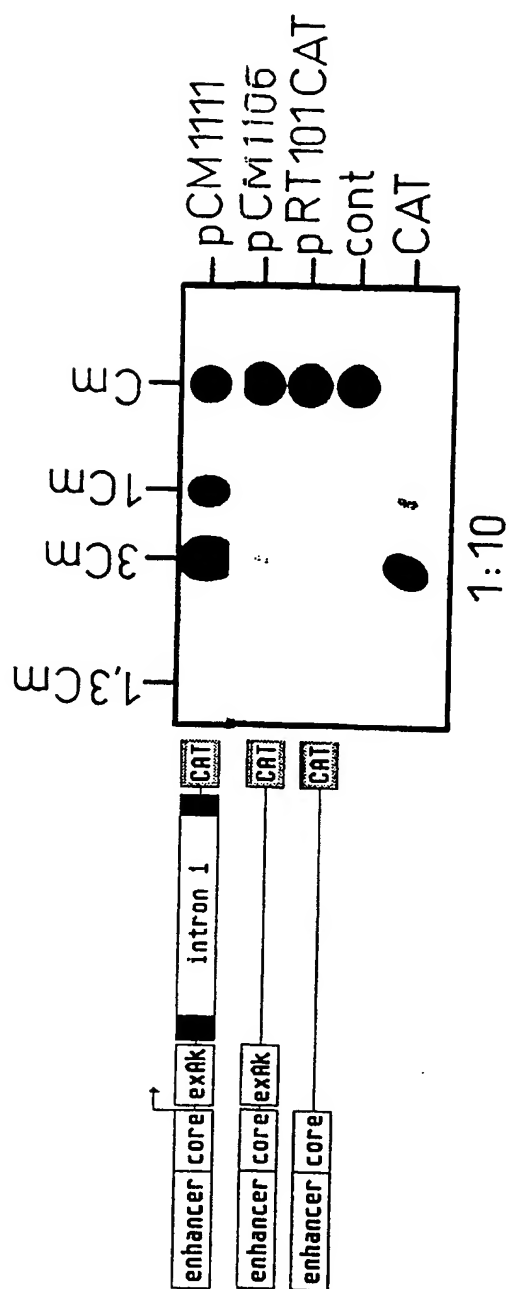
+4 ACCACCACCACCACCCTCCTCCCCC
TCGCTGCCGGACGACGAGCTCCTCCC +57

FIG. 3



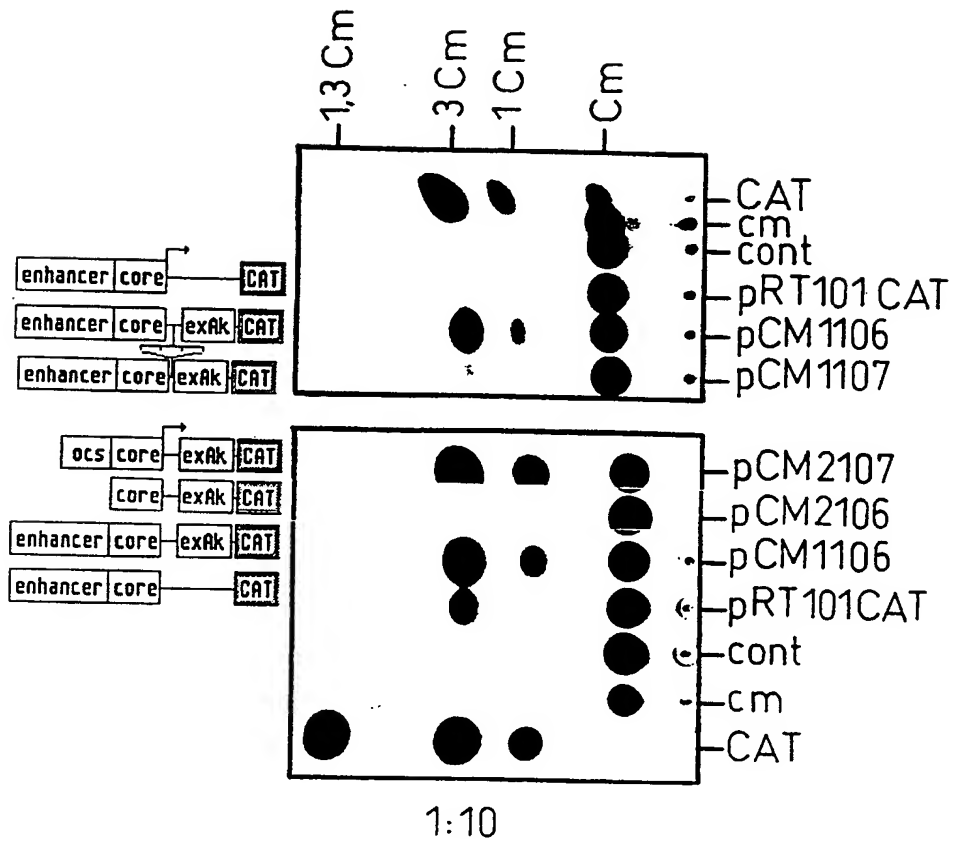
4/5

FIG. 4



5/5

FIG. 5



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 93/01769

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl. ⁵ C12N15/82; C12N15/29; C12N5/10; A01H5/00 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl. ⁵ C12N; A01H Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	PLANT MOLECULAR BIOLOGY. Vol.16, 1991, DORDRECHT, THE NETHERLANDS. pages 199-207 MAAS, C., ET AL. "The combination of a novel stimulatory element in the first exon of the maize Shrunk-1 gene with the following intron 1 enhances reporter gene expression up to 1000-fold" see the whole document	1-8
A	THE PLANT CELL. Vol.2, No.2, February 1990, ROCKVILLE, MD, USA. pages 163 - 171 MCELROY, D., ET AL. "Isolation of an efficient actin promoter for use in rice transformation" cited in the application see the whole document	1-8
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 21 October 1993 (21.10.93)		Date of mailing of the international search report 29 October 1993 (29.10.93)
Name and mailing address of the ISA/ EUROPEAN PATENT OFFICE Facsimile No.		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 93/01769

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MOL.GEN.GENET. Vol.231, 1991, pages 150-160 MCELROY, D., ET AL. "Construction of expression vectors based on the rice actin 1 (Act 1) 5' region for use in monocot transformation" see the whole document	1-8
A	THE PLANT CELL Vol. 3, No. 11, November 1991, pages 1155-1165 ZHANG, W., ET AL. "Analysis of rice Act1 5' region activity in transgenic rice plants" see the whole document	7

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

PCT/EP 93/01769

Internationales Aktenzeichen

I. KLASSIFIKATION DES ANMELDUNGSGEGENSTANDS (bei mehreren Klassifikationssymbolen sind alle anzugeben) ⁶		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC		
Int.Kl. 5 C12N15/82; C12N15/29; C12N5/10; A01H5/00		
II. RECHERCHIERTE SACHGEBIETE		
Recherchierter Mindestprüfstoff ⁷		
Klassifikationssystem	Klassifikationssymbole	
Int.Kl. 5	C12N ; A01H	
Recherchierte nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen ⁸		
III. EINSCHLAGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN ⁹		
Art. ⁹	Kennzeichnung der Veröffentlichung ¹¹ , soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile ¹²	Betr. Anspruch Nr. ¹³
A	<p>PLANT MOLECULAR BIOLOGY. Bd. 16, 1991, DORDRECHT, THE NETHERLANDS. Seiten 199 - 207 MAAS, C., ET AL. 'The combination of a novel stimulatory element in the first exon of the maize Shrunken-1 gene with the following intron 1 enhances reporter gene expression up to 1000-fold' siehe das ganze Dokument</p> <p style="text-align: center;">---</p> <p style="text-align: right;">-/--</p>	1-8
<p>¹⁰ Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen ¹⁰ :</p> <p>"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</p> <p>"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)</p> <p>"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</p> <p>"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist</p> <p>"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden</p> <p>"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist</p> <p>"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p>		
IV. BESCHENIGUNG		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche		Absenddatum des internationalen Recherchenberichts
21. OKTOBER 1993		29 -10- 1993
Internationale Recherchenbehörde		Unterschrift des bevollmächtigten Bediensteten
EUROPAISCHES PATENTAMT		MADDOX A.D.

III. EINSCHLAGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN (Fortsetzung von Blatt 2)		
Art °	Kennzeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>THE PLANT CELL. Bd. 2, Nr. 2, Februar 1990, ROCKVILLE, MD, USA. Seiten 163 - 171 MCELROY, D., ET AL. 'Isolation of an efficient actin promoter for use in rice transformation' in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---</p>	1-8
A	<p>MOL.GEN.GENET. Bd. 231, 1991, Seiten 150 - 160 MCELROY, D., ET AL. 'Construction of expression vectors based on the rice actin 1 (Act 1) 5' region for use in monocot transformation' siehe das ganze Dokument ---</p>	1-8
A	<p>THE PLANT CELL Bd. 3, Nr. 11, November 1991, Seiten 1155 - 1165 ZHANG, W., ET AL. 'Analysis of rice Act1 5' region activity in transgenic rice plants' siehe das ganze Dokument -----</p>	7